学校编码：10384　　分类号__密级__
学号：K0526001　　UDC___

厦门大学

硕士研究生学位论文

基于微球技术的流式细胞术检测下呼吸道感染病原菌方法的建立

Microsphere-Based Flow Cytometry for the Microbiological Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infection

作者姓名 黄松洁

指导教师姓名：欧阳高亮 杨天赐 教授
专 业 名 称：生物化学与分子生物学
论文提交日期：2011-09-29
论文答辩时间：2011-12-12
学位授予日期：

答辩委员会主席：王团老
评阅人：_____

2011 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外,该学位论文为(　　)课题(组)的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

摘 要

传统的流式细胞术所能获得的参数主要限于细胞、细菌或颗粒的大小、形状及其比率，难以对生物医学上有重要意义的核酸、蛋白质进行检测分析。但随着化学材料科学的发展，各种人工微球应运而生，以微球为基础，流式细胞检测技术得到迅速的发展，其应用领域也得到极大的拓展。

本实验拟以聚苯乙烯微球为载体，通过共价结合方式结合核酸捕获探针，用来特异性识别并捕获待测核酸序列，再加上荧光素标记的核酸检测探针，三者在同一液相体系中杂交，然后应用流式细胞技术进行检测分析。另外，我们利用不同大小的微球和标记不同荧光素的探针进行组合编码，从而实现了在同一检测中对不同核酸靶序列的多重检测。

我们将该多重检测方法应用于下呼吸道感染常见病原菌的检测。我们通过多重PCR反应扩增了大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌等下呼吸道感染常见病原菌的靶基因序列，并将靶基因序列与不同大小的微球及标记不同荧光素的探针进行液相杂交，最后应用流式细胞术进行检测分析。

本实验灵敏度主要取决于多重PCR的灵敏度，实验中多重PCR灵敏度达500copies/ml，可以满足临床需求。多重PCR实验经优化后，各菌株DNA的扩增效率较一致，经流式细胞仪检测后，阳性微球百分率分别为：大肠埃希菌18.7%，肺炎克雷伯菌17.8%，铜绿假单胞菌19.2%，肺炎链球菌20.1%。在液相杂交中未发现明显的非特异性杂交。液相杂交及流式细胞术检测重复性良好，批内CV在3.46%～5.00%之间。对40例临床细菌培养分离菌株的检测阳性率为100%。因此，本实验建立的基于微球技术的流式细胞术检测下呼吸道感染病原菌的方法灵敏度高、重复性良好、特异性强。但要在临床推广应用，尚需进一步优化实验、控制好背景荧光的稳定性及对实验数据进行更科学的分析处理。

关键词：流式细胞术；微球；下呼吸道感染

Abstract

Traditionally the flow cytometry could be used to analyze the size, shape and proportion of cells, bacteria or particle, but could not be used to detect and analyze the nucleic acids or proteins. But with the development of chemical materials science, all kinds of artificial microspheres emerged. Basing on microspheres, flow cytometry has been developed rapidly, and its applications have also been greatly extended.

Carboxy funcfionalized polystyrene microsphere is an important carrier in our experiment.The external carboxy group can be activated to couple with the probes. The microspheres coupled with nucleic acid probe capture the analytes which then bind with fluorescent-labeled nucleic acid probes. Through the detection and analysis of the microsphere fluorescence intensity and the microsphere size by the flow cytometry,the analytes can be identified significantly.

The multiple-detection method was applied for the detection of lower respiratory tract infection pathogenic bacteria, we amplified the target gene sequences of escherichia coli, klebsiella pneumoniae, pseudomonas aeruginosa and streptococcus pneumoniae by multiplex PCR, then the target gene sequences and the microspheres coupled with probes and the fluorescent-labeled probes were hybrided in liquid-phase, finally the the target gene sequences were detected and analyzed by flow cytometry.

The experimental sensitivity is mainly depends on the sensitivity of multiplex PCR, which sensitivity is up to 500copies/ml. the amplification efficiency of 4 strains DNA is not obviously different to each orther, after being detected by flow cytometry, positive rate of microspheres is as follows: escherichia 18.7%,klebsiella pneumoniae 17.8%, pseudomonas aeruginosa 19.2%, streptococcus pneumoniae 20.1%. There is no significant non-specific hybridization.The reproducibility of Liquid-phase hybridization and flow cytometric detection is acceptable, coefficient variation of five repeatat detections was 3.46%~5.00%.40 separated stains were identified successfully, positive rate is 100％. Microsphere-based flow cytometry for the microbiological

diagnosis of lower respiratory tract infection is developed.This experiment can exactly identify 1 to 4 target pathogenic bacteria in the same reaction with better sensitivity，specificity and reproducibility．but there are also some important problems suggested to be solved which include optimization of experiment，stability of backgroud fluorescence and scientific analysis of numerical data．

Keywords: flow cytometry; microsphere; lower respiratory tract infection

目 录

Contents